



LA REGIÓN PROMOTORA EN LOS GENES DE GLICOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc mesenteroides*

Abraham. Itzcoatl Acatzi Silva y Maricarmen Quirasco Baruch

L-312 Conj. E, Fac. de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México.
quirabma@servidor.unam.mx, tel. y fax (55) 5622-5305.

Palabras clave: *Leuconostoc mesenteroides*, glicosiltransferasas, región promotora.

Introducción. *Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria ácido láctica que produce glicosiltransferasas (GT) de uso biotecnológico, como las dextransacarasas y levansacarasas que catalizan la síntesis de biopolímeros y oligosacáridos de interés industrial. El interés científico se ha centrado en el estudio cinético y en la secuenciación de los genes de las GT presentes en *L. mesenteroides*. Sin embargo, el estudio de los mecanismos de regulación para la expresión de estas enzimas ha sido escaso. Dentro del grupo de trabajo se reportó la región promotora del gen *dsr-S* en la cepa B-512F⁽¹⁾ y, posteriormente en el Centro de Investigación de Nestlé se determinó la región promotora del gen *dsr-D* en la cepa Lcc4⁽²⁾. En ambos casos se encontró que la región -10 es canónica a la -10 en los procariontes, pero la secuencia en la región -35 estaba muy alejada del consenso. Por lo cual, se planteó la hipótesis de que la región promotora del -35 era característica del género *Leuconostoc* y/o que un factor sigma alternativo llevara a cabo el inicio de la transcripción en estos genes. El conocimiento de la región promotora aportará información para el diseño de vectores de expresión para este microorganismo.

El objetivo del trabajo fue identificar el inicio de la transcripción y región promotora de los genes encontrados en las siguientes cepas de *L. mesenteroides*: B-512F (*dsr-T* y *lev-S*), IBT-PQ (*dsr-P*), B-1299 (*dsr-B*) y B-1355 (*asr* y *dsr-C*).

Metodología. El inicio de la transcripción se determinó mediante el sistema de 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen®), el protocolo involucró la extracción del ARN total de cada cepa, cultivadas en medio óptimo para la producción de DS. Se llevó a cabo la síntesis, amplificación y secuenciación del extremo 3' cDNA, mediante el uso de cebadores específicos.

Resultados y discusión. El alineamiento de las bases en la región promotora de las GT estudiadas reveló que la región -10 es conservada, por lo que es una señal de reconocimiento fuerte para el factor σ^{70} primario (Tabla 1). El análisis del total de las regiones promotoras mostró la aparición de un motivo GGn a una base río arriba de la caja -10, lo que podría ser considerado como elemento -10 extendido (EMDE) (Fig. 1). La única excepción a esta observación se encontró en el gene *asr*, donde sí se encontraron las bases TGn, típicas del EMDE⁽³⁾.

Tabla 1. Región promotora -35 y -10 en genes de GT

Bac.	Cepa	Gene	Región -35						Región -10						
			T ₈₂	T ₈₄	G ₇₈	A ₆₅	C ₅₄	A ₄₅	T ₈₀	A ₉₅	T ₁₅	A ₄₀	A ₅₀	T ₉₆	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-512	<i>dsr-S</i>	C	G	T	T	T	T	T	A	T	A	A	T	
		<i>dsr-T</i>	T	A	G	T	T	A	A	A	G	A	A	T	
	Lcc-4	<i>lev-S</i>	A	T	A	C	T	A	T	A	T	A	C	T	
		<i>dsr-D</i>	C	G	T	T	T	T	T	A	T	A	A	T	
	B-1355	<i>dsr-C</i>	T	A	T	A	A	G	T	A	T	A	A	T	
		<i>asr</i>	G	T	T	A	A	T	T	A	T	T	A	T	
	B-1299	<i>dsr-B</i>	T	A	T	A	C	G	T	A	T	A	A	T	
		<i>dsr-P</i>	A	A	G	T	A	T	T	A	T	G	A	T	
	Consenso (%)			T ₈₈	A ₅₀	T ₆₃	T ₅₀	T ₅₀	T ₅₀	T ₈₈	A ₁₀₀	T ₈₈	A ₇₅	A ₈₈	T ₁₀₀

La región -35 es menos conservada y es rica en nucleótidos de Timina, por lo cual se aleja del consenso en los procariontes (Tabla 1). Por último, río arriba de la caja -35 establecida, se encontró una zona rica en A+T característica del elemento UP reconocido por la subunidad α de la RNA polimerasa (Fig. 1)

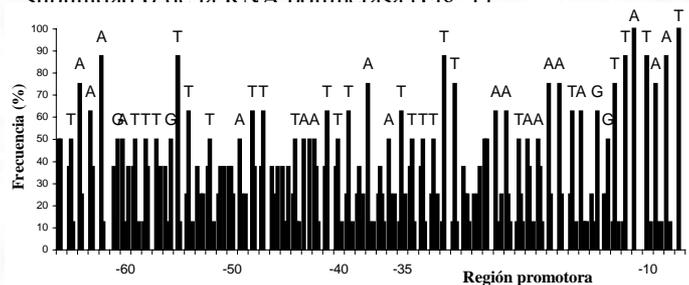


Figura 1. Frecuencia de bases en la región promotora de GT

Se demostró que el gene *dsr-T* sí se transcribe, ya que hasta el momento no se contaba con evidencia sólida de la existencia de dicho mensajero. Sin embargo, se sugiere que éste no se traduce, ya que la región Shine-Dalgarno establecida se localiza muy cercana al codón de la primera metionina, por lo cual el inicio de la traducción puede ser ineficiente o nulo. Además, se sugiere que su transcripción es baja, debido a que este gene posee la región promotora del -10 más alejada del consenso.

Se encontró que el inicio de la transcripción en los genes *dsr-C* (B-1355) y *dsr-B* (B-1299), que tienen un 99.9% de identidad, es el mismo. Sin embargo, se observó que el gene *dsr-C* sí se transcribe, contrario a lo reportado⁽⁴⁾, pero no se traduce por poseer la delección de una base justo después del segundo codón del marco de lectura abierto, lo cual ocasiona que se introduzca un codón de paro de la traducción. Así se explica por qué no se ha encontrado la proteína correspondiente a este gene.

Conclusiones. La región promotora de los genes GT posee señales de reconocimiento fuertes para que la RNA polimerasa comience la transcripción. Lo que explicaría, con bases moleculares firmes y con analogía a lo estudiado en otras bacterias, la razón por la que existe una alta expresión de estas enzimas en *L. mesenteroides*. Sin embargo, aún falta atribuir una función precisa tanto a las bases localizadas en la región -35, como a las secuencias espaciadoras, para explicar la mayor transcripción de estos genes en presencia de sacarosa. Adicionalmente, se demostró que los genes *dsr-T* y *dsr-C* sí se transcriben.

Agradecimientos. Proyecto financiado por PAIP 5490-16.

Bibliografía.

- (1) Quirasco *et al.*, 1999. *Appl. Environ. Microb.* 65: 5504-5509
- (2) Neubauer *et al.*, 2000. *Microbiology* 149:973-982.
- (3) Pager & Helmann. 2003. *Genome Biol.* 4:203
- (4) Argüello-Morales. Tesis. 2000